

氏 名	佐藤 法仁
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4535号
学位授与の日付	平成24年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	ストレプトマイシン依存性と耐性に関与する抗酸菌 16S リボソーム RNA 遺伝子変異の研究
学位論文審査委員	教授 仲野 道代 教授 大原 直也 教授 北山 滋雄

学位論文内容の要旨

グラム陽性桿菌である *Mycobacterium tuberculosis* (ヒト型結核菌) が引き起こす結核症は、世界レベルで蔓延している。世界保健機関 (World Health Organization : WHO) の2011年の報告では、全世界の3分の1の約20億人が結核菌に感染し、その中から年間約950万人が結核症を発症し、約200万人が死亡している「最大の感染症」のひとつである。わが国においても、1999年に厚生省(当時)から「結核緊急事態宣言」が出され、再興感染症として大きな問題となっている。

M. tuberculosis においても種々の抗生物質に対する耐性菌の存在は治療上、大きな問題となっている。薬剤耐性菌の中には特定の抗生物質に対して耐性を示すのみではなく、その抗生物質に増殖依存性を示す細菌も存在する。そのひとつが Streptomycin (SM) 増殖依存性 *M. tuberculosis* である。

SM は、はじめて使用された抗結核薬であり、結核症の治療において重要な薬剤とされてきた。SM を含むアミノグリコシド系抗生物質は、蛋白質合成を担うリボソームを標的とする。リボソームの 30S に結合し、蛋白質の合成を阻害することにより抗菌活性を示す。この阻害反応は、2段階で起こる。ひとつは開始段階の阻害である。もうひとつは伸長段階で、mRNA のコードの読み間違えを起こし、異常なアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖を合成する。この結果、異常な複合体や SM が結合した異常なモノマーが細胞内に蓄積し、正常なリボソーム機能が行なわれなくなる。SM 増殖依存性株は、本来 SM 存在下では増殖できない *M. tuberculosis* と違い、SM がなければ増殖しない菌株である。

M. tuberculosis の SM 増殖依存性株は、1948 年にはじめて報告された。1951 年には国立予防衛生研究所(現国立感染症研究所)の橋本博士が *M. tuberculosis* H2 株から実験的に SM 増殖依存性株を作製・分離することに成功し、この株を *M. tuberculosis* 18b 株と命名した。1995 年には、Honoré 博士らが *M. tuberculosis* 18b 株の 16S rRNA を調べた結果、530 loop 内の塩基配列の変異を報告し、この変異が SM 増殖依存性の原因であると推測した。なお、16S rRNA をコードする *rrsA* 遺伝子と S12 をコードする *rpsL* 遺伝子は、SM 耐性に関与する遺伝子であり、これらのいずれかの遺伝子に変異を持つ臨床分離 SM 耐性株が数多く報告されている。

ところで、*M. tuberculosis* 18b 株については、16S rRNA 530 loop 以外の領域においてどのような塩基配列を有しているのか、Honoré 博士らの報告した塩基の挿入変異が SM 増殖依存性増殖に関与しているのかについての検証は行われておらず、未だ不明な点が多い。また近年、低濃度 SM 耐性に関連し、16S rRNA 中の特定の塩基をメチル化する修飾酵素をコードする *gidB* 遺伝子の変異が SM 耐性に関与しているとの報告があり、*M. tuberculosis* 18b 株におけるこれら遺伝子の変異の有無を確認する必要がある。

本研究においては、第1に *M. tuberculosis* 18b 株の *rrsA*、*rpsL*、*gidB* の塩基配列を調べ、

SM 耐性との関連性が推測される変異部位を検出した。次に得られた結果をもとにワクチン株であるウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 弱毒株 bacillus Calmette-Guérin (BCG) を用いて変異株を作製し、変異部位が SM 増殖依存性に関与しているかを実証した。

国立感染症研究所に保管されていた冷凍保存 *M. tuberculosis* 18b 株バイアル中の菌液を一部採取し、SM 50 μ g/mL 添加 1%小川培地および 7H10-OADC 寒天培地に播種した。3 週間後、培地上に多くの集落が形成された。なお、SM 非含有 1%小川培地上にも 3 個の集落を得た。各集落からゲノム DNA を抽出し、直接塩基配列決定法により染色体上の *rrsA* の塩基配列を決定した。その結果、*rrsA* 上の 3 か所に塩基の挿入あるいは塩基置換が認められた。これら 3 か所の塩基の組み合わせにより得られた集落は、3 つのタイプに分類された。

M. tuberculosis 18b 株の 3 つのタイプの *rrsA*、*rpsL*、*gidB* の塩基配列を決定し、*M. tuberculosis* H37Rv 株と比較した結果、SM 耐性に関与している *gidB* 遺伝子や *rpsL* 遺伝子などに遺伝子変異は認められなかったが、16S rRNA の塩基 512 と 513 の間にシトシン (C) が挿入されたもの (512CC)、13 のアデニン (A) がグアニン (G) に置換し、かつ 512 と 513 の間に C が挿入されているもの (13G plus 512CC)、512 と 513 の間に C が挿入され、かつ 555 の C が A に置換されているもの (512CC plus 555A) の 3 タイプであった。この 3 タイプをもとに BCG 株を用いて、BCG 13G、BCG 512CC、BCG 555A、BCG 13G plus 512CC、BCG 512CC plus 555A の 5 つの 16S rRNA 変異株を作製した。なお、作製したすべての変異株は SM 耐性に関与する *gidB* 遺伝子と *rpsL* 遺伝子に変異がないことを直接塩基配列決定法により確認した。

BCG 変異株の培養実験において、13G、555A、13G plus 512CC、512CC plus 555A の変異株は、SM 0~200 μ g/mL 添加 7H10-OADC 寒天培地において集落が形成された。この結果から、これらの変異株は SM 耐性を持つことが確認された。他方、BCG 512CC は、SM 0~100 μ g/mL 添加 7H10-OADC 寒天培地においては集落が形成されず、SM 200 μ g/mL 以上では集落が形成された。また、7H9-ADC-Tween80 液体培地を用いた培養実験においても同様の結果が得られた。

次に BCG 512CC の SM 増殖依存性を追試するため、培養途中で培地を置換する実験を行なった。最初に BCG 512CC を 200 μ g/mL 濃度の SM 含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地で増殖させた。増殖した菌を SM 非含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地で洗浄し、同じ培地で培養した。10 日後培養物を 2 群に分け、一方のみに SM を最終濃度 200 μ g/mL になるように添加し培養を続けた。その結果、SM を添加した群では濁度の上昇は認められたが、SM 非添加群では濁度の上昇は認められなかった。また、BCG 512CC を SM 200 μ g/mL 含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地で OD₅₉₀ 1.0 に達するまで培養した。OD₅₉₀ 1.0 になった菌体を新鮮な 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 3 回洗浄後 2 群に分け、それぞれ SM 200 μ g/mL 含有および非含有 7H9-ADC-Tween80 培地で培養を続けた。その結果、SM 非含有添加群では、わずかな増殖が認められたのみであったが、SM 200 μ g/mL を添加した群では有意に増殖が認められた。

以上から、*M. tuberculosis* 18b 株は、16S rRNA の 512CC の変異が SM 増殖依存性に関与していることが実証された。SM 耐性については、16S rRNA の 13 番目の塩基 A が G に置換された BCG 13G が SM 耐性を賦与することは *Mycobacterium* 属では今まで知られておらず、本研究によりはじめて示された。また、555 番目の塩基 C が A に置換された BCG 555A が SM 耐性を賦与する点も我々の知る限りすべての細菌において、本報告がはじめてであった。

学位論文審査結果の要旨

Streptomycin (SM) は、結核症の治療薬としてはじめて使用された薬剤であるが、1948年に SM に対して増殖依存性を示す菌株が報告された。1951年には国立予防衛生研究所(現国立感染症研究所)の橋本達一郎博士が結核菌臨床分離株 H2 株から実験的に SM に増殖依存性を示す菌株を作製・分離し、*Mycobacterium tuberculosis* 18b 株と命名した。

申請者は、18b 株の *rrsA*、*rpsL*、*gidB* の塩基配列を調べ、SM 耐性／依存性との関連性が推測される変異部位を検出した。次に候補となった変異をもとにワクチン株であるウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 弱毒株 bacillus Culmette-Guérin (BCG) を用いて変異株を作製して SM 耐性／依存性の検討を行い、18b 株で検出された特定の変異が SM 増殖依存性を賦与することを実験的に証明した。

本研究で、明らかとなったことは下記のとおりである。

- 1) 18b 株保存バイアル中の複数のクローンを調べたところ *rpsL*、*gidB* には変異は認められなかった。しかし、*rrsA* には塩基配列の置換、挿入が3箇所見つかри、その変異の組合せにより、次の3つのタイプに分類された。
 - (i) 塩基 512 と 513 の間にシトシン (C) が挿入されたタイプ (512CC)
 - (ii) (i) の変異に加え、塩基 13 のアデニン (A) がグアニン (G) に置換されたタイプ (13G plus 512CC)
 - (iii) (i) の変異に加え、塩基 555 の C が A に置換されたタイプ (512CC plus 555A)
- 2) 1) の結果をもとに BCG 株を用いて、BCG 13G、BCG 512CC、BCG 555A、BCG 13G plus 512CC、BCG 512CC plus 555A の5つの 16S rRNA 変異株を作製した。培養実験の結果、BCG 13G、BCG 555A、BCG 13G plus 512CC、BCG 512CC plus 555A は、供した SM 濃度に関わらず寒天培地において集落が形成され、SM 耐性を示した。

なお、13G 変異が SM 耐性を賦与することは *Mycobacterium* 属では今まで知られておらず、本研究によりはじめて示された。また、555A 変異が SM 耐性を賦与する点はすべての細菌において、本報告がはじめてであった。
- 3) BCG 512CC は、SM 0-100 μ g/mL 添加寒天培地においては集落が形成されず、SM 200 μ g/mL 以上では集落が形成された。また、液体培地を用いた培養実験においても同様の結果が得られた。BCG 512CC を用いて培地置換実験を行った結果、SM 非添加培地から SM 200 μ g/mL 添加培地に置換した場合、BCG 512CC は増殖を開始した。また、SM 200 μ g/mL 添加培地から、SM 非添加培地に置換した場合、置換直後にはわずかな増殖を示したもののその後増殖が停止した。以上から、*rrsA* 上の 512CC の変異が増殖依存性に関与することが実証された。

以上の SM 増殖依存性、耐性に関する報告は新しい知見であり、今後の微生物学研究の発展のみならず感染症制圧に対しても大きな意味を持つ有用な研究成果であると考える。

よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。